

# 几种诱导物质对皱纹盘鲍幼虫变态的相互作用

洪旭光 阚金军 吴宝铃

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛, 266003)

**摘 要** 本文研究用不同浓度的氯化钾(KCl)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)和足粘液相结合对皱纹盘鲍幼虫变态的影响, 从中找出皱纹盘鲍幼虫诱导变态的最佳条件, 为人工育苗提供科学依据。

**关键词** 诱导物质 幼虫变态 皱纹盘鲍

皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai* Ino 是食植物性的腹足纲动物, 是人们喜食、价格很高的一种海产品。由于过度采捕致使自然产量急剧下降, 市场供不应求。鲍的生活史中, 变态是十分重要的环节。变态在生活史中只有一次, 是不可逆的; 变态的成功与否直接关系到鲍的存活与生长。在鲍的实际生产中存在着幼虫变态率很低的问题。目前研究状况表明, 有许多诱导剂能诱导鲍幼虫的变态, 如 GABA 和 KCl 及鲍成体或幼体的足粘液等<sup>[2~11]</sup>。本文报道了作者 1994 年 4~6 月在荣成市海带育苗场所做的有关皱纹盘鲍幼虫生物学的工作。本项研究运用正交实验方法, 主要通过以上 3 种物质对皱纹盘鲍幼虫变态过程中的相互作用, 从生态学角度来探究皱纹盘鲍幼虫变态的机理, 找出最佳的作用浓度及 3 种物质之间的相互作用的规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 浮游幼虫的培养

将 3~4 龄的性腺发育饱满的成鲍, 用紫外线照射过的海水刺激亲鲍, 温度  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 使之分别释放雌雄配子, 进行人工受精。受精后 0.5h 进行洗卵, 然后每 2h 换一次水, 并轻轻搅动以防胚胎结块。海水 pH 控制在 7.8~8.1, 盐度 34。经沉淀、砂滤, 然后用  $5\mu\text{m}$  筛绢过滤。在幼虫培养和实验期间充气, 不投饵, 不使用抗生素。

### 1.2 药品配制和足粘液的制取

用 KCl 和 GABA 先配成适当浓度的母液(与海水等渗), 然后再用过滤海水配制所需

本文于 1996 年 3 月 21 日收到, 修改稿于 1996 年 8 月 27 日收到。

\* 国家攀登计划 B 资助项目。

浓度的溶液。鲍足粘液制取选用1~1.5cm的幼鲍在小烧杯中爬行0h, 2h, 4h, 12h, 24h使其足粘液附在器皿底部上。实验前用海水冲3次, 洗去表面杂质。足粘液浓度用单位幼体单位时间爬行时所分泌的粘液来表示(h/个)。

### 1.3 幼虫变态的生物学检测

选择几种水平进行正交设计, 按  $L_{25}(5)^5$  表进行实验, 其中  $K^+$  浓度分别为0, 10, 20, 40和50 mmol, GABA 浓度分别为0,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ 和 $10^{-5}$  mol, 足粘液浓度分别为0, 2, 4, 12和24h/个(表1)。取受精后4d的面盘幼虫, 在上述溶液中药浴24h, 再全部换新鲜过滤海水, 继续培养, 分别在24h和48h后镜检计数: 幼虫总数、死亡数、变态数, 并计算幼虫变态率。皱纹盘鲍幼虫变态的依据是次生壳的形成。

以上实验均重复3次, 结果用正交实验方差分析方法进行分析。

表1 不同诱地物对皱纹盘鲍幼虫变态影响的实验和结果

Table 1 Experimental design and results of the effect of different inducers on larval metamorphosis of *Haliotis discus hannai*

|    | K <sup>+</sup> 浓度(mmol) | GABA 浓度(mol)       | 足粘作用时间(h/个) | 变态率( $\times 10^{-2}$ ) |
|----|-------------------------|--------------------|-------------|-------------------------|
| 1  | 0                       | 0                  | 0           | 40.0                    |
| 2  | 0                       | $10^{-7}$          | 2           | 42.9                    |
| 3  | 0                       | $5 \times 10^{-7}$ | 4           | 88.9                    |
| 4  | 0                       | $10^{-6}$          | 12          | 90.9                    |
| 5  | 0                       | $10^{-5}$          | 24          | 66.7                    |
| 6  | 10                      | 0                  | 4           | 62.0                    |
| 7  | 10                      | $10^{-7}$          | 12          | 72.7                    |
| 8  | 10                      | $5 \times 10^{-7}$ | 24          | 75.0                    |
| 9  | 10                      | $10^{-6}$          | 0           | 40.0                    |
| 10 | 10                      | $10^{-5}$          | 2           | 80.0                    |
| 11 | 20                      | 0                  | 24          | 94.5                    |
| 12 | 20                      | $10^{-7}$          | 0           | 28.6                    |
| 13 | 20                      | $5 \times 10^{-7}$ | 2           | 60.0                    |
| 14 | 20                      | $10^{-6}$          | 4           | 50.0                    |
| 15 | 20                      | $10^{-5}$          | 12          | 83.3                    |
| 16 | 40                      | 0                  | 2           | 100.0                   |
| 17 | 40                      | $10^{-7}$          | 4           | 57.1                    |
| 18 | 40                      | $5 \times 10^{-7}$ | 12          | 70.0                    |
| 19 | 40                      | $10^{-6}$          | 24          | 80.0                    |
| 20 | 40                      | $10^{-5}$          | 0           | 71.4                    |
| 21 | 50                      | 0                  | 12          | 60.0                    |
| 22 | 50                      | $10^{-7}$          | 24          | 71.4                    |
| 23 | 50                      | $5 \times 10^{-7}$ | 0           | 50.0                    |
| 24 | 50                      | $10^{-6}$          | 2           | 33.3                    |
| 25 | 50                      | $10^{-5}$          | 4           | 71.4                    |

## 2 结果

为进一步探讨多因子结合条件对皱纹盘鲍幼虫变态影响,我们在前人单因子实验的基础上,进行了3种因子结合实验,将实验处理列入正交实验表1,受精后4d的面盘幼虫药浴24h,换新鲜过滤海水培养24h后镜检,无变态,部分幼虫处于匍匐期;48h后镜检,结果如表1所示。将表1的数据进行幼虫变态率的正交实验方差分析,其显著性差异见表2。由此可见,GABA、 $K^+$ 和足粘液对幼虫变态的影响极显著,其中 $K^+$ 和足粘液,GABA与足粘液的相互作用极显著,而 $K^+$ 和GABA相互作用有影响,皱纹盘鲍幼虫变态的最佳条件是 $A_1B_3C_1$ ,即 $K^+$ 为40mmol,GABA为 $10^{-5}$ mol,足粘液浓度为12h/个或24h/个,12h/个和24h/个的作用结果相近。

表2 皱纹盘鲍幼虫变态率正交实验方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal test of metamorphic rate in larvae of *Haliotis discus hannai*

| DATA 见表1            |           |          | 总和平均值66.9     |                           |                          |
|---------------------|-----------|----------|---------------|---------------------------|--------------------------|
| SK 值                |           |          |               |                           |                          |
| A<br>K <sup>+</sup> | B<br>GABA | C<br>足粘液 | D<br>GABA×足粘液 | E<br>K <sup>+</sup> ×GABA | F<br>K <sup>+</sup> ×足粘液 |
| 329.4               | 356.6     | 230.0    | 311.4         | 288.7                     | 324.1                    |
| 330.2               | 272.7     | 316.2    | 318.7         | 339.4                     | 272.1                    |
| 316.0               | 343.9     | 329.9    | 360.4         | 356.2                     | 299.3                    |
| 378.5               | 294.2     | 376.9    | 365.9         | 328.9                     | 261.4                    |
| 286.1               | 372.8     | 387.2    | 283.8         | 327.0                     | 383.6                    |
| 各因素平方和自由度           |           |          |               |                           |                          |
| 10350.29            | 4456.66   | 7278.34  | 15642.7       | 4801.86                   | 2471.5                   |
| 4                   | 4         | 4        | 4             | 4                         | 4                        |
| “F 值”和显著性           |           |          |               |                           |                          |
| 5.41                | 8.835     | 18.988   | 5.329         | 3.00                      | 18.988                   |
| 极显著                 | 极显著       | 极显著      | 极显著           | 有影响                       | 极显著                      |

## 3 讨论

从结果看出, $K^+$ 、GABA和足粘液对皱纹盘鲍幼虫变态的诱导作用都极显著,大量的研究指出幼虫的变态受神经系统的调节<sup>[8,6,7,10]</sup>。变态诱导剂作用于幼虫的化学感受器(receptor),使离子透性增加,离子出入膜变得更为容易,从而引起细胞膜的去极化(电冲动),即发生膜电位的变化。膜电位的变化转变成神经冲动传入幼虫的中枢神经系统,中枢系统控制幼虫的行为:游泳能力减弱,面盘纤毛摆动减弱,纤毛逐渐脱落,面盘消失,进而转向匍匐期,然后产生成体器官完成变态。

Yool 等(1986)实验表明, $K^+$ 对红鲍幼虫的附着和变态有显著作用,因为  $K^+$  的电化学梯度变化影响到兴奋性细胞的膜电位<sup>[11]</sup>。Baloun 和 Morse 指出, $K^+$ 对变态诱导作用是通过一种诱导通道,从而促使邻近的细胞去极化来完成的<sup>[2]</sup>。本实验结果表明, $K^+$ 浓度 10mmol 和 20mmol 与 0mmol 对照相比基本不起作用,40mmol 时诱导效果最明显,浓度过高(50mmol)则对幼虫变态有抑制作用,使之变态率降低(表2)。

据报道,GABA 对许多无脊椎动物的幼虫变态有诱导作用。因为 GABA 是许多无脊椎动物的神经递质,有可能直接作用于幼虫的神经末梢,引起去极化反应,使离子通透性发生改变,从而幼虫产生相应的反应,即发生变态。本实验中,GABA 对皱纹盘鲍幼虫的诱导作用十分显著,其最佳作用浓度为  $10^{-5}$ mol,与杨宇等(1995)工作结果相同。而 Morse 等(1980,1984)提出  $10^{-6}$ mol 的 GABA 对红鲍幼虫变态效果最显著,这可能与种属差异有关。从 GABA 作用机制上说是相同的。

Slattery(1992)提出成鲍或幼鲍的足粘液对本种幼虫变态的诱导作用相当显著,幼虫变态率高达  $97.4 \times 10^{-2}$ 。这与我们的实验结果完全相同。本次实验观察到足粘液对同种幼虫的附着的诱导作用极其明显,足粘液上往往附着许多幼虫,这些幼虫的变态率也很高。Slattery 还提出,爬行 72h 和 24h 的足粘液对幼虫变态的诱导效应无显著差异,足粘液诱导幼虫变态与其浓度无关系。本实验设计 0h, 2h, 4h, 12h, 24h 的足粘液浓度梯度,发现在低浓度的作用下是明显的上升趋势,而单位幼体爬行 12h 和 24h 足粘液对幼虫的诱导作用基本相同,差异很小。我们认为变态率应与浓度有关,爬行 12h 或 24h 以后是因为浓度趋于饱和而无变化,但关于成鲍或幼鲍分泌的足粘液的具体成份还未见报道,其诱导同种幼虫附着和变态的机制更有待进一步探讨和研究。

从多因子试验中考察的两个指标看,可以准确地得出诱导幼虫变态的最优条件,使之更接近于实际状况。通过正交实验方差分析,发现  $K^+$ 和足粘液,GABA 和足粘液相互作用极显著, $K^+$ 和 GABA 相互作用不显著,但有影响。

Baloun and Morse(1984)提出,没有  $K^+$ 的作用仅有 GABA 对幼虫的变态效果不明显。 $K^+$ 和 GABA 共同存在时比  $K^+$ 或 GABA 单独存在时的诱导效果明显。因为 GABA 作为诱导物作用于幼虫的化学感受器,然后  $K^+$ 使膜通透性增高,膜电位变化从而导致变态。因此,只有 GABA 足粘液而没有  $K^+$ 不能完成变态, $K^+$ 的存在是必不可少的,也就是说变态是二者相互作用来完成的。GABA 的诱导作用对神经交换阻断剂(SITS)和  $K^+$ 的阻断剂(TEA)敏感,而  $K^+$ 仅对 TEA 敏感,SITS 存在时对  $K^+$ 无抑制作用,这些相互的敏感性表明  $K^+$ 和 GABA 诱导作用的途径是相分离的<sup>[12]</sup>。Yang et al(1995)报道了足粘液对幼虫的变态诱导作用和细胞外  $K^+$ 浓度有关。当海水中没有  $K^+$ 时足粘液不能诱导幼虫变态。同样,在幼虫定向附着的实验中,虽然  $10^{-5}$ mol GABA, 40mmol KCl 和海水中,幼虫仍然喜欢在有足粘液的底质附着和变态,但幼虫的这种选择性受 KCl 影响。综上所述,前人的结果证实了本文所提出的结论: $K^+$ 和足粘液,GABA 和足粘液, $K^+$ 和 GABA 具有交互整和作用,对幼虫变态诱导作用比单因子显著。但 GABA 和足粘液尚未有报道,有待于进一步研究。

多因子相结合实验是在单因子试验基础之上选择较适宜条件进行安排的,目的是选择皱纹盘鲍幼虫变态的最佳条件。采用正交试验综合设计,把多种物质诱导变态结合分析,既能节省试验时间和精力,又能减小系统误差,使结果更准确地反映客观。对于  $K^+$ 、足

粘液、GABA 三者的联合作用,我们的结果表明: $K^+$  40mmol, GABA  $10^{-5}$  mol, 足粘液浓度 24h/个为最佳条件,这在生产上有重要的意义。

### 参 考 文 献

- 1 上海市科学技术交流站主编,正文实验设计法—多因素的实验方法,上海:上海人民出版社,1975
- 2 Baloun A J, Morse D E. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biol. Bull.* , 1984, 167: 124~138
- 3 Hadfield M G, Pennington J T. Nature of the metamorphic signal and its internal transduction in larvae of the nudibranch *Phyllidia sibogae*. *Bulletin of Marine Science*, 1990, 48(2): 455~464
- 4 Morse D E et al. GABA induces behavioral and developmental metamorphosis in planktonic molluscan larvae. *Federation Proceedings* , 1980; 39 (14): 3237~3241
- 5 Morse N C, Froyd C A, Morse D E. Molecules from cyanobacteria and red algae that induce larval settlement and metamorphosis in the mollusc *Haliotis rufescens*. *Marine Biology*, 1984, 81: 293~298
- 6 Pawlik J. R. , Chemical induction of larval settlement and metamorphosis, in the reef-building tube worm *Phragmipoma californica* . *Marine Biology*, 1986; 91: 59~68
- 7 Pechenik J A, Heyman W D. Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Grepidula fornicata* (L.). *J. Exp. Mar. Biol.* , 1987, 112: 27~38
- 8 Slattery M. Larval settlement and juvenile survival in the red abalone (*Haliotis rufescens*); an examination of inductive cues and substrate selection. *Aquaculture* , 1992, 102: 143~153
- 9 Trapido-Rosenthal H G, Morse D E. Regulation of receptor-mediated settlement and metamorphosis in larvae of a Gastropod mollusc (*Haliotis rufescens*). *Bulletin of Marine Science*, 1985, 39(2): 383~39
- 10 Yang Yu, Wu B L. Induction of larval settlement and metamorphosis of *Haliotis discus Hannai* Tao (Gastropoda, Mollusca) . *CHIN. J. Oceanol. Limnol.* , 1995, 13 (1): 71~77
- 11 Yool A J et al. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. *Biol. Bull.* , 1986, 170: 255~266